

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum.
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
4. März 2004 (04.03.2004)

PCT

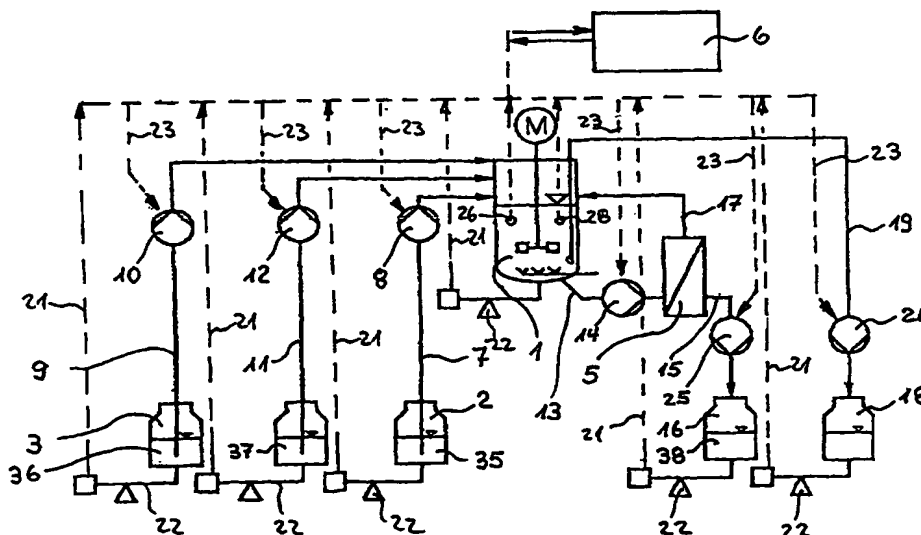
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/018692 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12P 21/00, (72) Erfinder; und
C07K 1/34, C12M 1/36 (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LUTTMANN,
Reiner [DE/DE]; Petritorwall 30b, 38118 Braunschweig
(DE). KAPPEL, Wilfried [DE/DE]; Bahnhofstr. 17,
34320 Söhrewald (DE). GLIEM, Toralf [DE/DE]; Am
Hopfenort 28, 34212 Melsungen (DE). AJAM, Moham-
mad Saeed [DE/DE]; Kirchstr. 15c, 37081 Göttingen
(DE). BOETTCHER, Lars [DE/DE]; Waldstr. 39, 34212
Melsungen (DE). WILHELM, Bernd-Ulrich [DE/DE];
A-Hofer-Str. 53, 15370 Petershagen (DE). RIETSCHEL,
Wolfgang [DE/DE]; Obere Bergstr. 2, 34320 Söhrewald
(DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/006565
- (22) Internationales Anmeldedatum:
21. Juni 2003 (21.06.2003)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
102 37 082.6 9. August 2002 (09.08.2002) DE (81) Bestimmungsstaat (national): US.
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): SARTORIUS AG [DE/DE]; Weender Landstr.
94-108, 37075 Göttingen (DE). (84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT,
BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR,
HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR THE BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF VALUABLE PRODUCTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR BIOTECHNOLOGISCHEN HERSTELLUNG VON
WERTSTOFFEN



(57) Abstract: Disclosed are a method and a device for the biotechnological production of valuable products, in which a medium is fed to a bioreactor and is subjected to a fermentation process, the valuable product is gathered as a filtered permeate and/or concentrated retentate via a cross-flow filtration system that is mounted downstream thereof, and residues are once again fed to the bioreactor until being gathered as a retentate. Other materials can be fed to the bioreactor in a controlled manner in addition to the medium while the concentrated retentate and permeate can be gathered in a controlled manner. The fermentation process and the filtration process are regulated in a synchronized manner in an integrated system via a digital control unit.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) Zusammenfassung: Verfahren und Vorrichtung zur biotechnologischen Herstellung von Wertstoffen bei dem einem Bioreaktor ein Medium zugefüttert und einem Fermentationsprozess unterzogen wird und bei dem über eine nachgeschaltete Querstromfiltrationsanlage der Wertstoff als gefiltertes Permeat und/oder als konzentriertes Retentat geerntet wird und Rückstände dem Bioreaktor bis zur Ernte als Retentat wieder zugeführt werden, wobei neben dem Medium weitere Stoffe dem Bioreaktor kontrolliert zugefüttert werden können, wobei das konzentrierte Retentat und das Permeat kontrolliert geerntet werden können, und wobei über eine digitale Kontrolleinheit der Fermentationsprozess und die Filtration in einem integrierten System aufeinander abgestimmt geregelt werden.

5 **Verfahren und Vorrichtung zur biotechnologischen Herstellung
von Wertstoffen**

Beschreibung

10 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur biotechnologischen
Herstellung von Wertstoffen, bei dem einem Bioreaktor ein Me-
dium zugefüttert und einem Fermentationsprozess unterzogen
wird, und bei dem über eine nachgeschaltete Querstromfiltra-
tionsanlage der Wertstoff als gefiltertes Permeat und / oder
15 als konzentriertes Retentat geerntet wird und Rückstände dem
Bioreaktor bis zur Ernte als Retentat wieder zugeführt wer-
den.

Die Erfindung betrifft weiterhin eine Vorrichtung zur bio-
20 technologischen Herstellung von Wertstoffen, im Wesentlichen
bestehend aus einem Bioreaktor mit einem vorgeschalteten ers-
ten Zufütterbehälter für ein Medium und einer nachgelagerten
Querstromfiltrationsanlage, deren Permeatleitung mit einem
ersten Erntebehälter verbunden ist und deren Retentatleitung
25 in den Bioreaktor zurückführt.

Ein Verfahren zur biotechnischen Herstellung von Wertstoffen
ist beispielsweise aus der EP 0 307 737 B1 bekannt. Insbeson-
dere für die Herstellung rekombinanter Proteine ergibt sich
30 jedoch ein Widerspruch zwischen einer möglichst hohen Zell-
produktivität (Hochzelldichtekultivierung) und einer langen
Standzeit der Membranen (Cross-Flow-Membranen) von Querstrom-
mikrofiltrationsanlagen. Insbesondere kann es bei einer Erhö-
hung des Permeatfluxes über einen bestimmten Grenzwert bei
35 gegebener Biomassekonzentration in der Produktlösung zu einem
dramatischen Anstieg des Transmembrandruckes und damit zu ei-

nem Zusetzen der Membranporen, zu einem sogenannten Membranfouling, kommen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, den Fermentierungs- und Filtrationsprozess so zu verbessern, dass bei
5 möglichst hoher Zellproduktivität eine möglichst lange Standzeit der Membranen der Querstromfiltrationsanlage erreicht werden kann.

10 Diese Aufgabe wird in Verbindung mit dem Oberbegriff des Anspruchs 1 dadurch gelöst, dass neben dem Medium weitere Stoffe dem Bioreaktor kontrolliert zugefüttert werden können, dass das konzentrierte Retentat und das Permeat kontrolliert geerntet werden können und dass über eine Kontrolleinheit der
15 Fermentationsprozess und die Filtration in einem integrierten System aufeinander abgestimmt geregelt werden.

Dadurch, dass der Fermentationsprozess und die Filtration in einem integrierten System aufeinander abgestimmt geregelt
20 werden, so dass insbesondere die Zufütterung von Stoffen und die Ernte kontrolliert erfolgen kann, wird zuverlässig erreicht, dass kritische Werte, die die Standzeit der Membranen verringern könnten, vermieden werden. Insbesondere ist es so möglich, den Überströmdruck durch den die Produktionslösung,
25 die die Wertstoffe enthält, an der Membran vorbeigeführt wird, größer zu halten als den Transmembrandruck quer zur Membran, wodurch sich die Standzeit der Membran erhöht.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung kann
30 das integrierte System von der digitalen Kontrolleinheit gesteuert einer in-situ-Reinigung und Sterilisation unterzogen werden. Dadurch wird eine schnelle und sichere Reinigung und Sterilisation ermöglicht.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden als Wertstoffe rekombinante Proteine hergestellt, wobei das Permeat eine zellfreie Ernte und das Retentat eine zellbehaftete Ernte ergibt. Der Prozessablauf kann dabei im Rahmen einer sequentiellen integrierten Prozessführung erfolgen. In einer Batchphase können dabei dem Bioreaktor zugeführte Zellen an das Medium adaptieren und in einer anschließenden Fed Batchphase die Zellen durch Zufütterung mit konstanter Wachstumsrate angezogen werden. In einer anschließenden Produktionsphase erfolgt durch Zugabe eines Induktionsstoffes die Induktion der Produktbildung und die eigentliche Herstellung der rekombinanten Proteine. Die Konzentration des Induktionsstoffes kann dabei vorteilhaft über eine Fließdiffusionsanalyse gemessen und über Zufütterung aus einer Vorlage geregelt werden. In einer an die Produktionsphase anschließenden Produkterntephase wird dann ein Teil des Bioreaktors zellfrei abgeerntet. Die Zellmasse des Retentats wird in einer Zellerntephase abgeerntet, der sich eine Mediumrefreshphase mit einer Zufütterung anschließen kann. Nach der Mediumrefreshphase beginnt der eigentliche zyklische Prozess, bei dem außer in der Produkternte nur der Retentat- aber nicht der Permeatstrom fließen soll, mit der Produktionsphase neu.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden die rekombinanten Proteine unter Verwendung der Hefe *Pichia pastoris* hergestellt. Die Hefe ist ähnlich leicht zu kultivieren wie *E.coli*, sie ist aber als Eukaryot viel besser für eine korrekte Faltung der rekombinanten Proteine geeignet. Weiterhin ist sie fähig, Proteine zu glycolysieren, was wichtig für deren strukturelle Vollständigkeit, Löslichkeit und biologische Aktivität ist. Darüber hinaus können Hefenproteine über die Zellwand ausscheiden (Sekretion) damit die Trennung der gewünschten Produkte von zellulären Bestandteilen stark erleichtern.

Nach einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird zur Induktion der Sequenzen des Zellproteins als Induktionsstoff Methanol in das Medium des Bioreaktors zugegeben. Dabei wird die Methanolkonzentration auf einem konstanten Level gehalten.

Da die Sequenzen des Zielproteins in den nativen Genabschnitt zur Expression einer Alkoholoxidase (AOX) von *P. pastoris* integriert werden, erfolgt durch eine Zugabe von Methanol in das Medium deren Induktion.

Dadurch, dass die Methanolkonzentration auf einem möglichst konstanten Level im unteren Gramm / Liter-Bereich gehalten wird, wird eine Überfütterung, die toxisch wirken könnte, vermieden. Durch eine Online-Messung und Regelung der Methanolkonzentration über die erwähnte Fließdiffusionsanalyse wird der konstante Level der Methanolkonzentration ermöglicht.

Nach einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird in der Fed Batchphase und / oder in der Produktionsphase zur Produktionssteigerung Glycerol zugefüttert.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung verläuft der Prozessablauf im Rahmen einer kontinuierlichen integrierten Prozessführung. Dabei laufen die Produktionsphase, die Produkterntephase und die Zellerntephase parallel ab. Damit wird eine permanente Produkt- und Turbidostat-zellernte, letztere zur Aufrechterhaltung der Membranfunktionalität, ermöglicht.

Da für *P. pastoris* geeignete sekretorische Gensequenzen zur Verfügung stehen, können die gewünschten Produkte mittels integrierten Bioprozess hergestellt werden. Dabei können sowohl prozessvorbereitende Schritte (up stream), beginnend mit der

Konstruktion produktionsgeeigneter Expressionssysteme bis hin zur Vorkulturführung, als auch nachfolgender Primäraufbearbeitungsschritte (down stream) in die eigentlich Reaktionsführung, d.h. Zellkultivierung und Produktbildung, eingebunden werden. Durch diese Prozessführung werden die umweltbelastenden Aufarbeitungsschritte einer Proteinprozessierung mit E.coli vermieden. Die Produkternte während des Kultivierungsablaufes kann hier direkt in nachfolgenden Feinreinigungsschritten für die korrekt prozessierten Proteine überführt werden.

Die beispielsweise aus der EP 0 307 737 B1 bekannte Vorrichtung weist die für die bekannten Verfahren beschriebenen Nachteile auf.

15

Weitere Aufgabe der Erfindung ist es daher, die bekannten Vorrichtungen so zu verbessern, dass der bei der Herstellung rekombinanten Proteine bekannte Widerspruch einer möglichst hohen Zellproduktivität und einer langen Standzeit der Membranen gelöst wird.

20

Diese Aufgabe wird in Verbindung mit dem Oberbegriff des Anspruches 17 dadurch gelöst, dass mindestens ein zweiter Zufütterbehälter mit einem Induktionsstoff dem Bioreaktor vorgeschaltet ist, dass ein zweiter Erntebehälter für eine zellbehaftete Ernte des Retentats über eine Ernteleitung mit dem Biorektor verbunden ist und dass eine Kontrolleinheit zur Messung und Regelung des Fermentations- und Filtrationsprozesses angeordnet ist.

30

Durch die (digitale) Kontrolleinheit zur Messung und Regelung des Fermentations- und Filtrationsprozesses wird ein optimaler Prozessverlauf erzielt, der bei einer hohen Zellproduktivität eine lange Standzeit der Membranen ermöglicht.

35

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung weist zur Messung der Konzentration des Induktionsstoffes im Bioreaktor die Kontrolleinheit ein Analysesystem auf, das über einen im Bioreaktor angeordneten Sensor die Konzentration des Induktionsstoffes misst und durch Steuerung einer dem zweiten Zufütterbehälter vorgeschalteten Fütterpumpe die Induktionsstoffkonzentration im Bioreaktor regelt. Insbesondere bei einer kontinuierlichen integrierten Prozessführung ist das Analysesystem dabei als ein Fließdiffusionsanalysesystem ausgebildet. Dadurch wird vorteilhaft eine kontinuierliche Messung und Regelung ermöglicht.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung weist zur Messung einer Zellkonzentration im Bioreaktor die Kontrolleinheit ein zweites Analysesystem auf, das über einen im Bioreaktor angeordneten zweiten Sensor die Zellkonzentration misst und durch Steuerung einer dem zweiten Erntebehälter vorgeschalteten Erntepumpe die Zellkonzentration im Bioreaktor regelt.

Die Kontrolleinheit kann sämtliche regeltechnischen Aufgaben, die typisch für einen Fermentationsprozess sind, übernehmen, beispielsweise Messung und Regelung von Temperatur, pH-Wert, pO_2 -Wert über Begasungsrate und Gaszusammensetzung, Rührerdrehzahl, Schaumbekämpfung u.s.w.. Die Kontrolleinheit übernimmt auch die Regelung der Parameter der automatisierten Querstromfiltrationsanlage, wie Permeatstrom, Retentatstrom und die automatische in-situ-Reinigung und Sterilisation des integrierten Systems.

Als Querstromfiltrationsanlagen kommen Mikrofiltrations- und Ultrafiltrationsanlagen oder Kombinationen aus Mikro- und Ultrafiltrationsanlagen in Frage.

Weitere Einzelheiten der Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden ausführlichen Beschreibung und den beigefügten Zeichnungen, in denen bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung beispielsweise veranschaulicht sind.

5

In den Zeichnungen zeigen:

Figur 1: eine schematische Darstellung einer Vorrichtung zur biotechnologischen Herstellung von Wertstoffen,

10

Figur 2: einen Prozessablauf einer sequenziell integrier-
ten Prozessführung, bei dem das Reaktorvolumen V_L
und die Zellkonzentration c_{x1} (Biotrockenmasse)
in Abhängigkeit von der Zeit t aufgetragen sind
und

15

Figur 3: eine Vorrichtung zur biotechnologischen Herstel-
lung von Wertstoffen mit einem ersten und zweiten
Analysesystem einer nicht weiter dargestellten
digitalen Kontrolleinheit.

20

Eine Vorrichtung zur biotechnologischen Herstellung von Wertstoffen besteht im Wesentlichen aus einem Bioreaktor 1 mit
einem vorgeschalteten ersten Zufütterbehälter 2, einem zwei-
ten Zufütterbehälter 3, einem dritten Zufütterbehälter 4 und
einer nachgelagerten Querstromfiltrationsanlage 5, sowie ei-
ner Kontrolleinheit 6.

25

Der erste Zufütterbehälter 2 ist über eine erste Zufütterlei-
tung 7 und eine erste Zufütterpumpe 8 mit dem Bioreaktor 1
verbunden. Der zweite Zufütterbehälter 3 ist über eine zweite
Zufütterleitung 9 und eine zweite Zufütterpumpe 10 mit dem
Bioreaktor 1 verbunden. Der dritte Zufütterbehälter 4 ist ü-

30

ber eine dritte Zufütterleitung 11 und eine dritte Zufütterpumpe 12 ebenfalls mit dem Bioreaktor 1 verbunden.

Die Querstromfiltrationsanlage 5 ist dem Bioreaktor 1 nachgelagert und über eine Förderleitung 13 mit dem Bioreaktor 1 verbunden. Zwischen Bioreaktor 1 und Querstromfiltrationsanlage 5 ist eine Förderpumpe 14 angeordnet. Über eine Permeatleitung 15 und eine Permeatpumpe 25 ist die Querstromfiltrationsanlage 5 mit einem ersten Erntebehälter 16 verbunden. Die Querstromfiltrationsanlage 5 ist über eine Retentatleitung 17 mit dem Bioreaktor 1 verbunden. Ein zweiter Erntebehälter 18 ist für eine zellbehaftete Ernte des Retentats über eine Ernteleitung 19 und eine Harvestpumpe 20 mit dem Bioreaktor 1 verbunden.

Die digitale Kontrolleinheit 6 ist über Messleitungen 21 mit den Behältern 2, 3, 4, 16, 18 zugeordneten Wägevorrückungen 22 verbunden. Über Steuerleitungen 23 ist die Kontrolleinheit 6 mit den Pumpen 8, 10, 12, 14, 20 verbunden.

In Figur 2 ist der Prozessablauf einer sequenziell integrierten Prozessführung für die Herstellung rekombinanter Proteine unter Einsatz der Hefe *P. pastoris* dargestellt. Aufgetragen sind das Reaktorvolumen V_L des Bioreaktors 1 und die Zellkonzentration c_{x1} (Biotrockenmasse). In einer Batchphase 29 $t \in [0, t_1]$ adaptieren die Zellen an das Medium und werden bis ca. 15 gl^{-1} angezüchtet. Das Reaktorvolumen V_L nimmt durch Probenahme ab.

In einer Fed Batchphase 30 $t \in [t_1, t_2]$ werden die Zellen durch Zufütterung von Glycerol 37 bis 25 gl^{-1} mit konstanter (substratlimitierter) Wachstumsrate angezogen.

In der Produktionsphase 31 $t \in [t_2, t_3]$ erfolgt durch Zugabe von Methanol 36 als Induktionsstoff zunächst die Induktion der Produktbildung und die eigentliche Herstellung der rekombinanten Proteine.

5

Die Methanolkonzentration wird mit einem Analysesystem 24 der Kontrolleinheit 6, das als Fließdiffusionsanalyse-System (FDA) ausgebildet ist, gemessen und über Zufütterung aus dem zweiten Zufütterbehälter 3 - der Methanolvorlage - durch

10 Steuerung der zweiten Zufütterpumpe 10 geregelt.

Zur Produktionssteigerung kann in dieser Phase eine geringe Menge Glycerol 37 aus dem dritten Zufütterbehälter 4 durch Steuerung der dritten Zufütterpumpe 12 über die dritte Zufüt-

15 terleitung 11 dem Bioreaktor 1 zugegeben werden. Durch Zugabe von Medium 35 aus dem ersten Zufütterbehälter 2 über die erste Zufütterleitung 7 in den Bioreaktor 1 steigt das Reaktorvolumen V_L an und die Zellen wachsen vermindert weiter (im Beispiel bis 30 gl^{-1}). In der Produkterntephase 32 $t \in [t_3,$

20 $t_4]$ wird ein Viertel (Menge ist in Grenzen wahlfrei) des Bioreaktors 1 zellfrei als Permeat der Querstromfiltrationsanlage 5 abgeerntet. Das Permeat 38 fließt dabei über die Permeatpumpe 25 und die Permeatleitung 15 in den ersten Erntebehälter 16. Dadurch steigt die Zellkonzentration bis 40 gl^{-1}

25 an.

Ab t_6 wird wieder mit dem gleichen Produktions- und Erntezyklus wie bei t_2 mit ca. 25 gl^{-1} gestartet. In einer Zellerntephase 33 $t \in [t_4, t_5]$ wird über die Harvestpumpe 20 und die

30 Ernteleitung 19 Zellmasse bzw. Retentat aus dem Bioreaktor 1 in den zweiten Erntebehälter 18 abgelassen. In einer Mediumrefreshphase 34 $t \in [t_5, t_6]$ wird methanol- und glycerolfreies Medium 35 aus dem ersten Zufütterbehälter 2 dem Bioreaktor 1 zugegeben.

Ab t_6 beginnt der eigentliche zyklische Prozess, bei dem außer in der Produkternte 32 nur der Retentat- aber nicht der Permeatstrom fließen soll.

5

Die hier angegebenen Daten für Zeiten, Prozente u.s.w. sind nur für den untersuchten Prozess gültig. Sie können stark variieren. Eine Ausdehnung auf Zellkulturen ist möglich.

10 Bei einer kontinuierlichen integrierten Prozessführung laufen die drei Phasen 31, 32, 33 des Produktions- und Erntezyklus $t \in [t_2, t_6]$ parallel ab. Hierbei handelt es sich um ein vermaschtes Regelungsproblem, das über die digitale Kontrolleinheit 6 gemessen und geregelt wird.

15

In Figur 3 ist eine Vorrichtung zur biotechnologischen Herstellung von Wertstoffen mit einer kontinuierlichen integrierten Prozessführung dargestellt. Hierzu weist die in Figur 3 nicht weiter dargestellte Kontrolleinheit 6 ein Analysesystem 24 auf, das über einen im Bioreaktor 1 angeordneten Sensor 26 die Konzentration des Induktionsstoffes, im Beispiel die Methanolkonzentration, misst und durch Steuerung der dem zweiten Zufütterbehälter 3 vorgeschalteten Zufütterpumpe 10 die Induktionsstoff- bzw. Methanolkonzentration im Bioreaktor 1 geregelt. Das Analysesystem 24 ist dabei als ein Fließdiffusionsanalyse-System (FDA) ausgebildet. Über die Fließdiffusionsanalyse wird der Istwert der Methanolkonzentration gemessen und einem ersten Regler 39 zugeführt, der den Istwert mit dem Sollwert eines ersten Sollwertstellers 40 vergleicht und ein Steuersignal an die zweite Zufütterpumpe 10 gibt.

Zur Messung der Zellkonzentration im Bioreaktor 1 weist die Kontrolleinheit 5 ein zweites Analysesystem 27 auf. Das zweite Analysesystem 27 misst über einen im Bioreaktor 1 angeordneten zweiten Sensor 28 die Zellkonzentration und regelt

35

durch Steuerung einer dem zweiten Erntebehälter 18 vorgeschalteten Harvestpumpe 20 (Erntepumpe) die Zellkonzentration im Bioreaktor 1. Über einen mit dem zweiten Sensor 28 verbundenen Analysator 41 wird der Istwert der Zellkonzentration analysiert bzw. gemessen und einem zweiten Regler 42 zugeführt, der den Istwert mit dem Sollwert eines zweiten Sollwertstellers 43 vergleicht und ein Steuersignal an die Harvestpumpe 20 gibt.

10 Zur Regelung der Mediumzugabe in den Bioreaktor 1 erhält ein dritter Regler 44 von der Wägevorrichtung 22 des Bioreaktors 1 ein Istsignal und vergleicht das Istsignal bzw. den Istwert mit dem Sollwert eines dritten Sollwertstellers 45 und gibt ein entsprechendes Steuersignal an die erste Zufütterpumpe 8.

5 Patentansprüche

1. Verfahren zur biotechnologischen Herstellung von Wertstoffen bei dem einem Bioreaktor ein Medium zugefüttert und
10 einem Fermentationsprozess unterzogen wird und bei dem über eine nachgeschaltete Querstromfiltrationsanlage der Wertstoff als gefiltertes Permeat und / oder als konzentriertes Retentat geerntet wird und Rückstände dem Bioreaktor bis zur Ernte als Retentat wieder zugeführt werden, **dadurch gekennzeichnet**,
15 dass neben dem Medium weitere Stoffe dem Bioreaktor (1) kontrolliert zugefüttert werden können, dass das konzentrierte Retentat und das Permeat kontrolliert geerntet werden können, und dass über eine Kontrolleinheit (6) der Fermentationsprozess und die Filtration in einem integrierten System aufeinander
20 abgestimmt geregelt werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass das integrierte System von der Kontrolleinheit (6) gesteuert einer in-situ-Reinigung und Sterilisation unterzogen werden
25 kann.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass als Wertstoffe rekombinante Proteine hergestellt werden, wobei das Permeat eine zellfreie Ernte und das Retentat eine
30 zellbehaftete Ernte ergibt.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Prozessablauf im Rahmen einer sequentiellen integrierten Prozessführung erfolgt.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 oder 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass in einer Batchphase (29) dem Bioreaktor (1) zugeführte Zellen an das Medium adaptieren und in einer anschließenden Fed Batchphase (30) die Zellen durch Zufütterung mit konstanter Wachstumsrate angezogen werden.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass in einer Produktionsphase (31) durch Zugabe eines Induktionsstoffes die Induktion der Produktbildung und die eigentliche Herstellung der rekombinanten Proteine erfolgt.
7. Verfahren nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Konzentration des Induktionsstoffes über eine Fließdiffusionsanalyse gemessen und über Zufütterung aus einem zweiten Zufütterbehälter (3) geregelt wird.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass in einer Produkterntephase (32) ein Teil des Bioreaktors (1) zellfrei abgeerntet wird.
9. Verfahren nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass in einer Zellerntephase (33) Zellmasse des Retentats abgeerntet und eine Mediumrefreshphase (34) mit einer Zufütterung von Medium (35) angeschlossen wird.
10. Verfahren nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass nach der Mediumrefreshphase (34) der zyklische Prozess, bei dem außer in der Produkternte nur der Retentat- aber nicht der Permeatstrom fließen soll, mit der Produktionsphase (31) neu beginnt.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 10, **dadurch gekennzeichnet**, dass die rekombinanten Proteine unter Verwendung der Hefe *Pichia pastoris* hergestellt werden.

12. Verfahren nach Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet**, dass zur Induktion der Sequenzen des Zellproteins als Induktionsstoff Methanol (36) in das Medium (35) des Bioreaktors (1) zugegeben wird.

13. Verfahren nach Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Methanolkonzentration auf einem konstanten Level gehalten wird.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 13, **dadurch gekennzeichnet**, dass in der Fed Batchphase (30) und / oder in der Produktionsphase (31) zur Produktionssteigerung Glycerol (37) zugefüttert wird.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3 und 5 bis 14, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Prozessablauf im Rahmen einer kontinuierlichen integrierten Prozessführung verläuft.

16. Verfahren nach Anspruch 15, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Produktionsphase (31), die Produkterntephase (32) und die Zellerntephase (33) parallel ablaufen.

17. Vorrichtung zur biotechnologischen Herstellung von Wertstoffen im Wesentlichen bestehend aus einem Bioreaktor mit einem vorgeschalteten ersten Zufütterbehälter für ein Medium und einer nachgelagerten Querstromfiltrationsanlage, deren Permeatleitung mit einem ersten Erntebehälter verbunden ist und deren Retentatleitung in den Bioreaktor zurückführt, **dadurch gekennzeichnet**, dass mindestens ein zweiter Zufütterbehälter (3) mit einem Induktionsstoff dem Bioreaktor (1) vorgeschaltet ist, dass ein zweiter Erntebehälter (18) für eine

zellbehaftete Ernte des Retentats über eine Ernteleitung (19) mit dem Bioreaktor (1) verbunden ist, und dass eine Kontrolleinheit (6) zur Messung und Regelung des Fermentations- und Filtrationsprozesses angeordnet ist.

5 18. Vorrichtung nach Anspruch 17, **dadurch gekennzeichnet**, dass zur Messung der Konzentration des Induktionsstoffes im Bioreaktor (1) die Kontrolleinheit (6) ein Analysesystem (24) aufweist, das über einen im Bioreaktor (1) angeordneten Sensor die Konzentration des Induktionsstoffes misst und durch
10 Steuerung einer dem zweiten Zufütterbehälter (3) vorgeschalteten zweiten Zufütterpumpe (9) die Induktionsstoffkonzentration im Bioreaktor (1) regelt.

19. Vorrichtung nach Anspruch 18, **dadurch gekennzeichnet**,
15 dass das Analysesystem (24) als ein Fließdiffusionsanalyse-System (FDA) ausgebildet ist.

20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 17 bis 18, **dadurch gekennzeichnet**, dass zur Messung einer Zellkonzentration im
20 Bioreaktor (1) die Kontrolleinheit (6) ein zweites Analysesystem (27) aufweist, das über einen im Bioreaktor (1) angeordneten zweiten Sensor (28) die Zellkonzentration misst und durch Steuerung einer dem zweiten Erntebehälter (18) vorgeschalteten Harvestpumpe (20) die Zellkonzentration im Biore-
25 aktor (1) regelt.

21. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 17 bis 20, **dadurch gekennzeichnet**, dass zur Regelung der Mediumzugabe in den Bioreaktor (1) ein dritter Regler (44) über eine Wägevorrich-
30 tung (22) des Bioreaktors (1) mit einer Zufütterpumpe (8) verbunden ist.

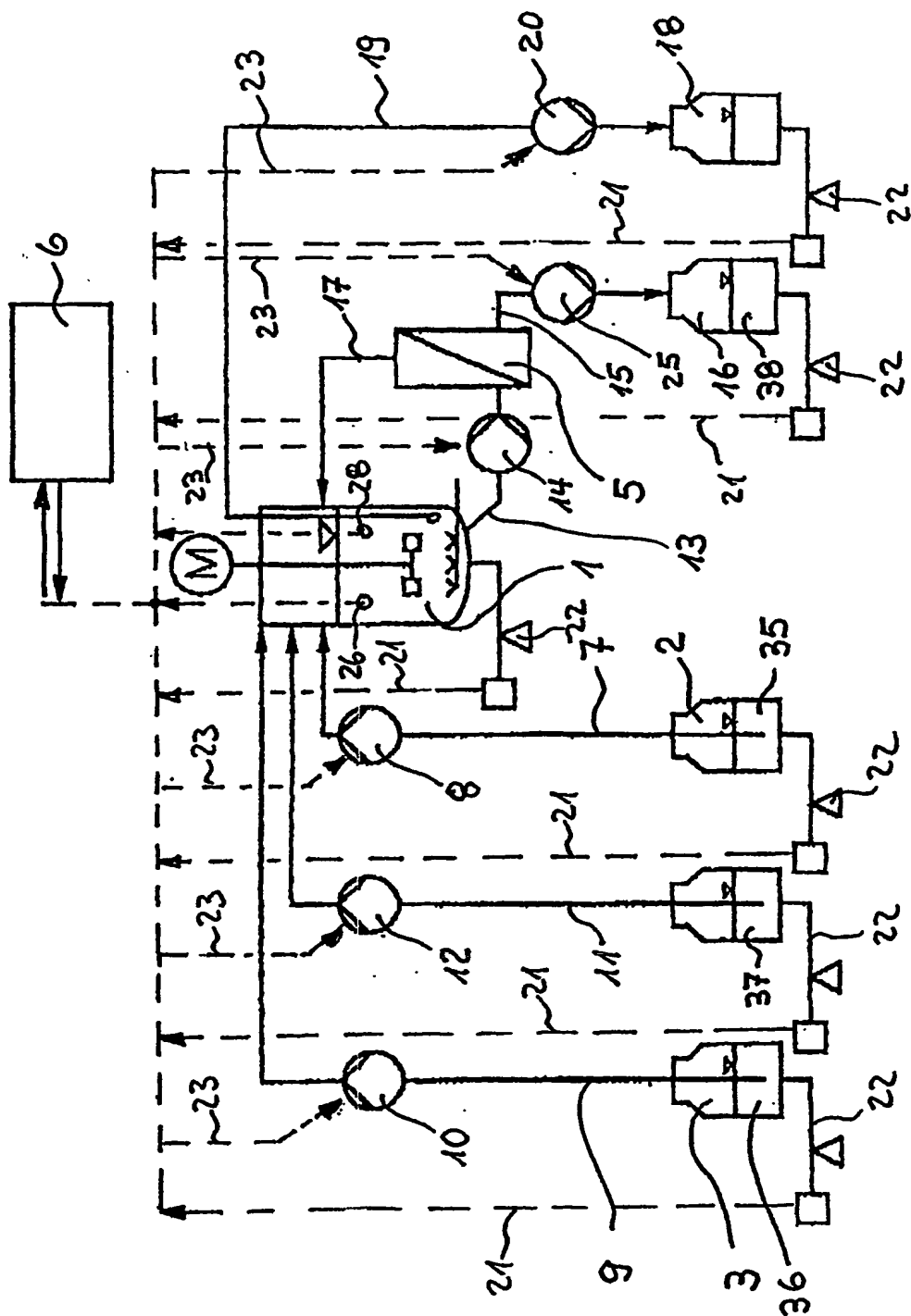


Fig. 1

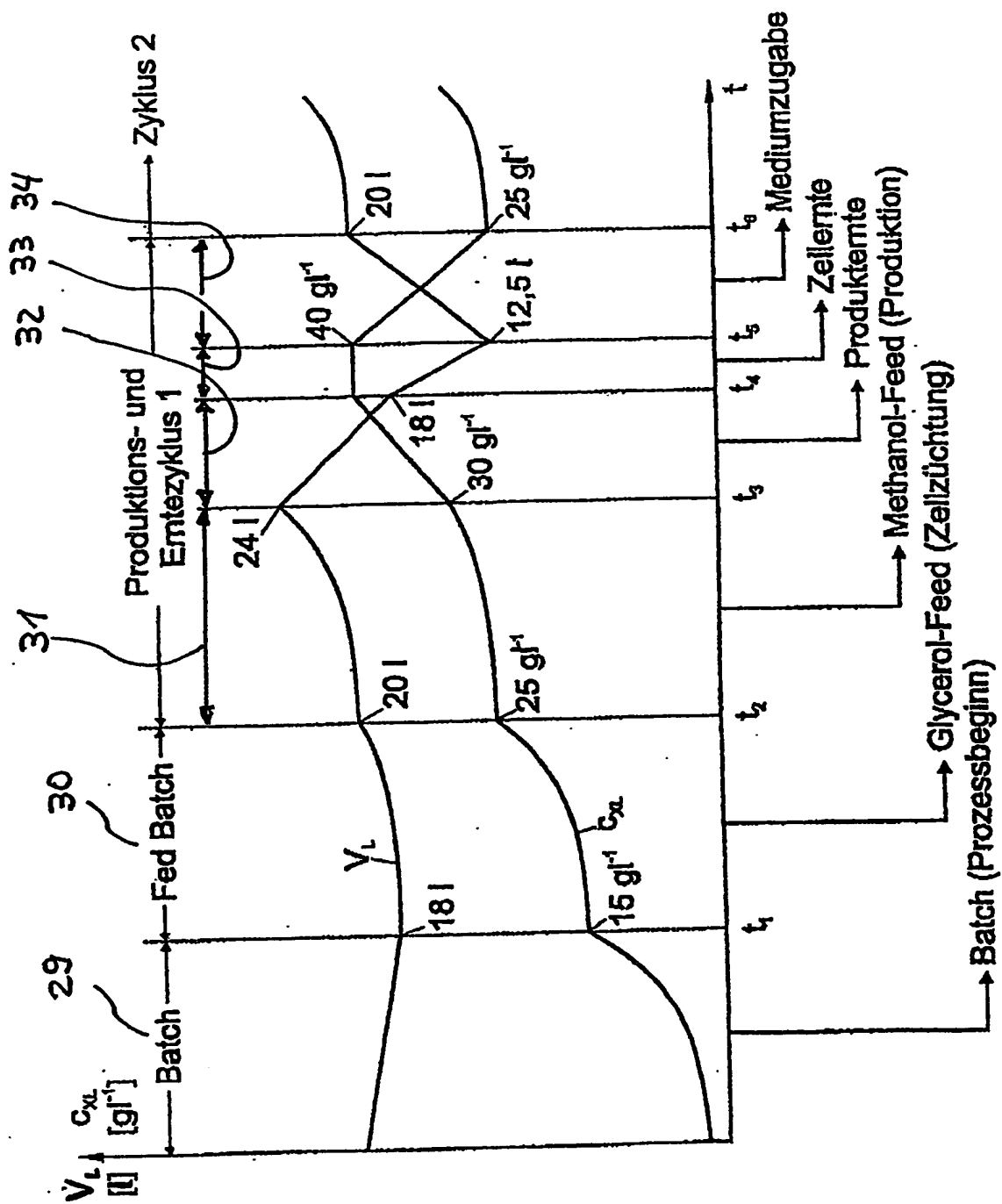


Fig. 2

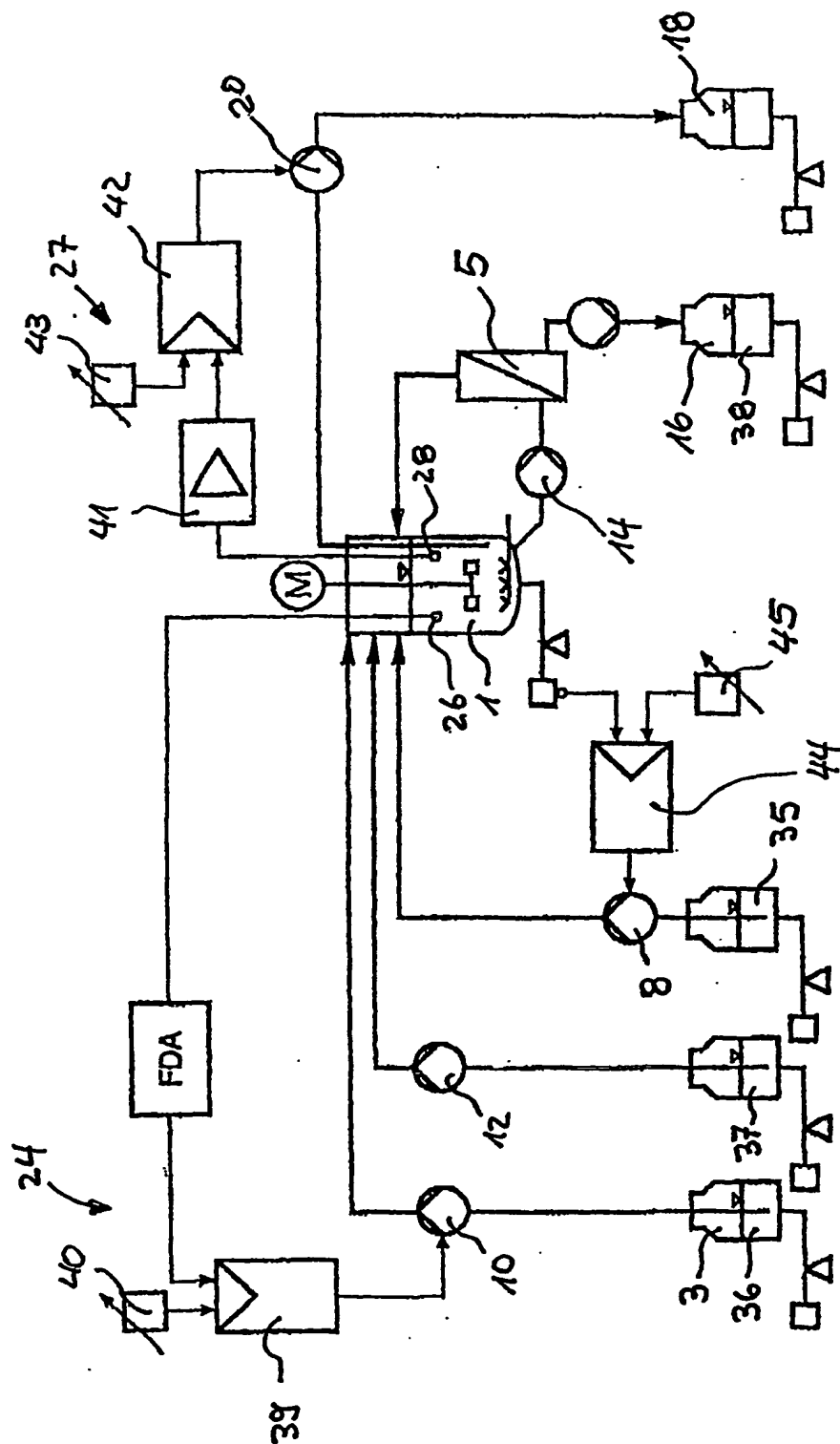


Fig. 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/06565

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 C12P21/00 C07K1/34 C12M1/36

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12M C12P C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 307 737 A (HENKEL KGAA) 22 March 1989 (1989-03-22) cited in the application page 3, column 4, line 27 - line 36; claims; figure 2 ---	1-21
Y	WO 91 02049 A (GRANDICS PETER ;SZATHMARY SUSAN (US)) 21 February 1991 (1991-02-21) figure 1 ---	1-21
Y	WO 01 32895 A (EASY BIO SYSTEM INC ;BOK JINDUCK (KR); SHIN MINSUN (KR); CHOI YUNJ) 10 May 2001 (2001-05-10) claims -----	1-21

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 November 2003

Date of mailing of the international search report

25/11/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ryckebosch, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/06565

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0307737	A	22-03-1989	DE 3730868 A1	23-03-1989
			AT 82702 T	15-12-1992
			DE 3876190 D1	07-01-1993
			DK 495388 A	16-03-1989
			EP 0307737 A2	22-03-1989
			JP 1101879 A	19-04-1989
			JP 2661716 B2	08-10-1997
			US 4886602 A	12-12-1989
WO 9102049	A	21-02-1991	AU 6355790 A	11-03-1991
			DE 69033032 D1	06-05-1999
			DE 69033032 T2	11-11-1999
			EP 0455757 A1	13-11-1991
			WO 9102049 A1	21-02-1991
			US 5571720 A	05-11-1996
WO 0132895	A	10-05-2001	KR 2000029179 A	25-05-2000
			AU 7042000 A	14-05-2001
			WO 0132895 A1	10-05-2001

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Internationale Patentzeichen

PCT/EP 03/06565

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12P21/00 C07K1/34 C12M1/36

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Researchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12M C12P C07K

Researchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die researchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP 0 307 737 A (HENKEL KGAA) 22. März 1989 (1989-03-22) in der Anmeldung erwähnt Seite 3, Spalte 4, Zeile 27 - Zeile 36; Ansprüche; Abbildung 2	1-21
Y	WO 91 02049 A (GRANDICS PETER ;SZATHMARY SUSAN (US)) 21. Februar 1991 (1991-02-21) Abbildung 1	1-21
Y	WO 01 32895 A (EASY BIO SYSTEM INC ;BOK JINDUCK (KR); SHIN MINSUN (KR); CHOI YUNJ) 10. Mai 2001 (2001-05-10) Ansprüche	1-21



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

18. November 2003

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

25/11/2003

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Ryckebosch, A

INTERNATIONALER RESEARCHBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationale Patentzeichen

PCT/EP 03/06565

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 0307737	A	22-03-1989	DE	3730868 A1	23-03-1989
			AT	82702 T	15-12-1992
			DE	3876190 D1	07-01-1993
			DK	495388 A	16-03-1989
			EP	0307737 A2	22-03-1989
			JP	1101879 A	19-04-1989
			JP	2661716 B2	08-10-1997
			US	4886602 A	12-12-1989
WO 9102049	A	21-02-1991	AU	6355790 A	11-03-1991
			DE	69033032 D1	06-05-1999
			DE	69033032 T2	11-11-1999
			EP	0455757 A1	13-11-1991
			WO	9102049 A1	21-02-1991
			US	5571720 A	05-11-1996
WO 0132895	A	10-05-2001	KR	2000029179 A	25-05-2000
			AU	7042000 A	14-05-2001
			WO	0132895 A1	10-05-2001